

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Jean-Jacques CABOCHE, Philippe LOOTEN,  
Carole PETITJEAN, Guy FLECHE,  
Serge COMINI and Daniel BACKER

Group Art Unit:

Examiner:

Serial No.: Not yet assigned  
(National phase USA of International  
Patent Application PCT No. FR00/01109  
filed April 26, 2000; Claiming Priority of  
French Appln. No. FR 99 05523, filed April 30, 1999)

Filed: (on even date herewith)

For: **SOLUBLE BRANCHED POLYMERS OF GLUCOSE AND PROCESS  
FOR PRODUCTION THEREOF**

**CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC 119**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:


A formal claim for the benefit of priority of the filing date of April 30, 1999 of prior French Patent Application No. FR 99 05523, referred to in the Declaration and Power of Attorney document as required by 37 C.F.R. 1.63, is hereby requested for the above-identified application.

Acknowledgment of this Claim of Priority by the Examiner and/or the Office in the next official communication mailed from the U.S. Patent and Trademark Office, is respectfully requested.

Respectfully submitted,

Jean-Jacques CABOCHE, Philippe LOOTEN,  
Carole PETITJEAN, Guy FLECHE,  
Serge COMINI and Daniel BACKER

10-22-01  
Date

By:   
Richard L. Fix  
Reg. No. 28,297

HENDERSON & STURM LLP  
206 Sixth Avenue, Suite 1213  
Des Moines, Iowa 50309-4076  
Telephone: (202) 296-3854  
Telefax: (202) 223-9606

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10-030055  
FR 00/1109  
15/05/2000

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 16 AUG 2000

WIPO PCT

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **28 AVR. 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>30 AVR 1999</b></p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>99 05523 -</b></p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>AS</b></p> <p>DATE DE DÉPÔT <b>30 AVR 1999</b></p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>Cabinet PLASSERAUD 84, rue d'Amsterdam 75440 PARIS CEDEX 09</p> <p>n° du pouvoir permanent PG 1273    références du correspondant DBo/ELD-BFF990126    téléphone 01 44 63 41 11</p>	
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention    <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité    <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> demande initiale</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention</p> <p>Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p><b>"Polymères solubles de glucose branchés et leur procédé d'obtention"</b></p>		<p>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN . . . . . code APE-NAF . . . . .</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p><b>ROQUETTE FRERES</b></p> <p>Forme juridique</p> <p><b>Société anonyme</b></p> <p>Nationalité (s) <b>Française</b></p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p><b>62136 LESTREM</b></p> <p><b>FRANCE</b></p>	
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>			
<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission</p>			
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <p>pays d'origine    numéro    date de dépôt    nature de la demande</p>			
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°    date    n°    date</p>			
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)</p> <p><b>D. BOULINGUIEZ</b></p> <p><b>CPI - N° 92-1035</b></p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION    SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p> <p></p>	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 05523

DBo/PDe

TITRE DE L'INVENTION: Polymères solubles de glucose branchés et leur procédé d'obtention.

La titulaire, ROQUETTE FRERES S.A.  
représentée par :

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) CABINET PLASSERAUD  
84? rue d'Amsterdam  
F-75440 PARIS CEDEX 09

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

1) CABOCHE Jean-Jacques  
Rue du Pré  
62131 DROUVIN LE MARAIS

2) FLECHE Guy  
15, rue Gambetta  
59190 HAZEBROUCK

3) LOOTEN Philippe  
66 Allée de l'Artois  
59130 LAMBERSAT

4) COMINI Serge  
42, rue du Beaupré  
59253 LA GORGUE

5) PETITJEAN Carole  
4, rue Lydéric  
59520 MARQUETTE LEZ LILLE

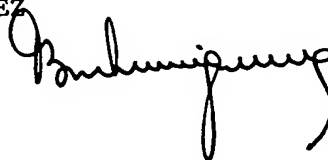
6) BACKER Daniel  
330, rue Berthelotte  
62350 SAINT VENANT

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 23 Juillet 1999

Didier BOULINGUIEZ  
CPI n° 92 1035





POLYMERES SOLUBLES DE GLUCOSE BRANCHES ET LEUR  
PROCEDE D'OBTENTION

L'invention a pour objet des polymères solubles de  
5 glucose branchés ne contenant substantiellement pas de  
liaisons  $\beta$  glucosidiques, qui présentent des teneurs  
particulières en liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6, une  
remarquable stabilité en solution, exprimée par leur faible  
tendance à la rétrogradation, une faible viscosité et des  
10 masses moléculaires élevées.

L'invention concerne également un procédé de  
fabrication desdits polymères solubles de glucose branchés.  
Elle vise encore des compositions comprenant de tels  
polymères solubles de glucose branchés qu'il est possible  
15 d'utiliser dans les industries alimentaires.

Au sens de l'invention, les polymères solubles de  
glucose branchés ne contenant substantiellement pas de  
liaisons  $\beta$  glucosidiques s'entendent de polymères de  
glucose lié en  $\alpha$ -1,4 et présentant de nombreux points de  
20 ramification (encore appelés points de branchement) en  
 $\alpha$ -1,6, et moins de 1 % de branchement en  $\beta$ , c'est-à-dire en  
 $\beta$ -1,2,  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,6.

Les polymères du glucose classiquement accessibles  
industriellement sont notamment issus des amidons naturels  
25 ou hybrides et de leurs dérivés. Généralement, l'amidon est  
constitué de deux polymères, l'amylose et l'amylopectine.  
L'amylose est la fraction renfermant des homopolymères  
linéaires de glucose liés en  $\alpha$ -1,4 et quelques points de  
branchement en  $\alpha$ -1,6. L'amylopectine est quant à elle la  
30 fraction ramifiée, constituée de chaînes linéaires de

glucose en  $\alpha$ -1,4 reliées à d'autres chaînes linéaires de glucose en  $\alpha$ -1,4 par des points de ramification en  $\alpha$ -1,6.

L'association de ces deux homopolymères, empaquetés sous la forme de granules d'amidon très bien structurés,  
5 constitue la réserve de source carbonée de la plante.

L'amidon produit dans chaque plante est constitué d'un pourcentage variable en chacun de ses constituants amylose et amylopectine, voire même d'une distribution particulière des poids moléculaires de chacun desdits  
10 homopolymères de glucose. Ce qui explique la raison pour laquelle les divers amidons et leurs dérivés sont habituellement classés en fonction de leur origine botanique..

Les propriétés fonctionnelles des amidons et de leurs  
15 dérivés sont en outre directement fonction de leur contenu en amylose et amylopectine. Ainsi, lorsque l'on chauffe une suspension d'amidon au delà de la température de gélatinisation, le granule d'amidon gonfle, et l'amylose se solubilise préférentiellement. Cependant, lors du  
20 refroidissement de la suspension, les homopolymères de glucose rétrogradent, rapidement pour l'amylose (quelques heures), et de manière plus lente pour l'amylopectine (quelques jours).

Or, les spécialistes du domaine de l'utilisation des  
25 amidons et des dérivés de l'amidon en industrie alimentaire s'accordent à dire que ce phénomène de rétrogradation affecte la texture des aliments, et en diminue la durée de vie.

Il est connu de rendre plus acceptables ces produits,  
30 en les préparant à partir de produits amylacés riches en amylopectine, et donc par exemple à partir des variétés

waxy. Cependant, la stabilité des gels et liants obtenus à partir desdits produits amylacés riches en amylopectine n'est pas suffisante pour les besoins des industries alimentaires, où il est parfois nécessaire d'avoir une  
5 durée de stockage de plusieurs mois.

Une première solution consiste à stabiliser les homopolymères de glucose, et ce grâce à des agents chimiques. Cette opération est la plupart du temps effectuée par la mise en oeuvre de réactions  
10 d'estérification ou d'éthérification. Il peut s'agir notamment de réactions d'acétylation ou d'hydroxypropylation. En outre, pour obtenir les propriétés de texture et de viscosité souhaitées, ces réactions sont souvent associées à une réaction de réticulation.

15 Ces modifications confèrent alors des propriétés rhéologiques remarquables aux amidons, les rendant plus résistants aux traitements mécaniques tels le cisaillement, ou aux milieux acides. L'acétylation ou l'hydroxypropylation confèrent en outre une bonne stabilité au  
20 stockage après cuisson.

Cependant, les produits ainsi obtenus présentent l'inconvénient d'avoir été traités chimiquement, ce qui est souvent mal perçu par les consommateurs.

Une seconde solution consiste à isoler l'amidon à  
25 partir de plantes dont certains gènes impliqués dans la biosynthèse de l'amidon ont été altérés, ce qui confère aux amidons ainsi modifiés des propriétés particulières.

Il peut s'agir de variétés mutantes ou hybrides, affectées au niveau des gènes waxy (wx), amylose extender  
30 (ae), dull (du), opaque (o) shrunken (sh), brittle (bt), ou sugary (su)...

Le brevet 4.767.849 décrit ainsi l'amidon extrait d'une variété de maïs homozygote pour le génotype waxy/shrunken-1, qui confère aux amidons granulaires ainsi obtenus des propriétés de stabilité à la rétrogradation en cycles de congélation/décongélation (classiquement appelés cycles de gel/dégel) équivalents aux amidons modifiés chimiquement. Cependant, ces variétés obtenues par croisement entre deux variétés de génotype waxy et shrunken ne présentent qu'une teneur en amidon comprise entre 1 et 20 % de la teneur en amidon normalement synthétisée par les variétés dites de type sauvage.

Il peut s'agir également de plantes génétiquement modifiées, obtenues par modification ciblée d'un gène ou d'un ensemble de gènes codant pour des enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'amidon. Les stratégies d'extinction ou d'amplification génique dans la plante, des gènes codant, par exemple, pour les enzymes de débranchement ou de branchement de l'amidon propres à la plante, ou d'origine exogène, tels les gènes de biosynthèse du glycogène des bactéries, ont été abondamment décrites.

Cependant, force est de constater, comme dans le cas des plantes mutantes ou hybrides, que si les amidons ainsi modifiés présentent des propriétés équivalentes aux amidons modifiés chimiquement, les teneurs en amidon des plantes ainsi obtenues sont loin d'être industriellement satisfaisantes.

Une première alternative à ces procédés consiste à utiliser des enzymes de type  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, pullulanase, iso-amylase pour modifier *in vitro* les amidons natifs afin de leur conférer certaines des propriétés des

amidons modifiés chimiquement. Il n'y a donc normalement plus de problèmes liés aux quantités mises en oeuvre.

La demande de brevet EP 539.910 décrit ainsi un procédé de préparation de granules d'amidon modifié par un  
5 traitement à l' $\alpha$ -amylase, pour obtenir des produits de moindre viscosité. Cependant, ce procédé ne vise qu'à altérer la structure du granule d'amidon, sans en modifier profondément les constituants.

Le brevet EP 574.721 décrit la préparation d'un  
10 produit amylicé à haute teneur en amylopectine stable, en n'utilisant pas de traitement chimique proprement dit, mais en effectuant une réaction d'hydrolyse contrôlée à la  $\beta$ -amylase sur un amidon granulaire natif.

Le produit ainsi préparé présente alors une absence  
15 de synérèse et de modification de viscosité dans le temps, et est stable au gel/dégel. Cependant, ce procédé nécessite une étape de traitement thermique préalable, à une température comprise entre 65 et 75°C, pour gélatiniser l'amidon avant de réaliser l'hydrolyse enzymatique  
20 proprement dite. De plus, il est surtout nécessaire de contrôler le taux d'hydrolyse pour le limiter à une valeur comprise entre 5 et 20 %.

Enfin, si ces composés présentent une grande stabilité au gel/dégel qui leur permet d'être  
25 avantageusement utilisés dans des préparations destinées à être stérilisées ou surgelées, aucune modification de la viscosité desdits composés n'est constatée, ce qui en limite les applications.

Une autre alternative aux procédés visant à modifier  
30 chimiquement les amidons natifs, ou à extraire des amidons natifs possédant des propriétés d'amidons modifiés à partir

de plantes mutantes, hybrides ou génétiquement modifiées, consiste à introduire *in vitro* de nouveaux points de branchement dans l'amidon.

5 Il s'agit alors de conduire un remaniement des chaînes d'amylopectine ou d'amylose, plutôt que de mettre en oeuvre des réactions de stabilisation et/ou de réticulation comme indiqué précédemment.

Deux techniques sont habituellement mises en oeuvre. La première utilise des moyens thermiques, la seconde des  
10 enzymes purifiées de biosynthèse du glycogène et/ou de l'amidon, telles les enzymes de branchement du glycogène ou de l'amidon, responsables respectivement de la synthèse des points de ramification en  $\alpha$ -1,6 du glycogène, ou des points de ramification en  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine et des  
15 quelques points de branchement de l'amylose.

La demande de brevet WO 95/22562 décrit par exemple des dextrines de type amidon, caractérisées par leur poids moléculaire compris entre  $15 \cdot 10^3$  et  $10^7$  daltons, et un degré de branchement compris entre 2 et 8 %, obtenues par  
20 le traitement, en conditions acides (acide orthophosphorique à 0,17 % en poids d'amidon) et à une température comprise entre 110 à 140°C pendant de 1 à 15 h, d'amidon granulaire natif, notamment de la fécule de pomme de terre.

25 La composition ainsi obtenue est destinée aux sportifs comme apport énergétique après un effort physique. Cependant, ce traitement est long et très lourd à mettre en oeuvre, et il conduit à des polymères de glucose qui renferment, outre une teneur élevée en liaisons  $\alpha$ -1,6 (de  
30 préférence comprise entre 3 et 7 %), de nouveaux types de liaisons qui n'existent pas normalement dans l'amidon

natif. Les analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) révèlent en effet des liaisons de type  $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,6, et des liaisons  $\alpha$  autres qu'en  $\alpha$ -1,4 et en  $\alpha$ -1,6.

De tout ce qui précède, il résulte qu'il y a donc un  
5 besoin non satisfait de disposer, d'une part, de polymères de glucose présentant des propriétés remarquables, notamment en terme de stabilité, de viscosité, de solubilité, et conférant par la même aux produits qui les  
10 contiennent des capacités plus grandes de durées de vie et de digestibilité, et d'autre part, de les obtenir sans utiliser de techniques chimiques ou physiques, ni d'avoir recours à des extractions à partir de plantes mutantes ou génétiquement modifiées.

La société Demanderesse a eu le mérite de concilier  
15 tous ces objectifs réputés jusqu'alors difficilement conciliables en imaginant et élaborant, au prix de nombreuses recherches, de nouveaux types de produits, à savoir de nouveaux polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons  $\beta$   
20 glucosidiques.

Les polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons  $\beta$  glucosidiques conformes à l'invention sont ainsi caractérisés par le fait qu'ils possèdent entre 4 et 6,5 % de liaisons glucosidiques  
25  $\alpha$ -1,6, une tendance très faible ou nulle à la rétrogradation en solution aqueuse, déterminée selon un test A, une viscosité déterminée selon un test B comprise entre 200 et 5.000 cP, et un poids moléculaire compris entre  $10^5$  et  $5.10^8$  daltons.

30 La teneur en liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6 des polymères solubles de glucose branchés conformes à

l'invention, déterminée par analyse RMN du proton, est de 4 à 6,5 %, exprimée en nombre de liaisons  $\alpha$ -1,6 par rapport au nombre total de liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 des dits polymères solubles de glucose branchés.

5        Cette teneur en liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6, confère à tout polymère soluble de glucose conforme à l'invention une structure particulière, en termes de degré de ramification et/ou de longueurs de chaînes ramifiées en regard de l'amidon ou du dérivé d'amidon dont il est issu.

10       Les longueurs des chaînes linéaires branchées sont déterminés par toute méthode connue en soi par l'homme du métier, par analyse en chromatographie liquide haute performance (HPLC) après débranchement à l'iso-amylase des polymères solubles de glucose, par exemple en suivant la  
15       technique développée par SANDERS et al. dans Cereal Chemistry, 1990, 67, 594-602.

      Les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention présentent une majorité de chaînes de degré de polymérisation (D.P.) 1 à 5, alors que l'amylopectine  
20       standard présente au contraire une majorité de chaînes de D.P. 6, D.P. 7 et D.P. 8, avec très peu de D.P. 1 à D.P. 5.

      Ce résultat traduit également une remarquable redistribution des longueurs de chaînes glucosidiques, par rapport aux amidons et dérivés d'amidon standards et  
25       modifiés. En effet, il est communément admis dans l'état de la technique que la redistribution de longueur de chaînes obtenue par l'action d'enzymes de branchement purifiées sur de l'amylopectine se traduit plutôt en moyenne par un  
30       transfert de chaînes de D.P. 5 à D.P. 10, avec un transfert plus particulier de chaînes de D.P. 7., ou de chaînes de



D.P. supérieur à 10, en fonction des enzymes de branchement considérées.

Les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention présentent également une faible tendance à la  
5 rétrogradation en solution aqueuse, déterminée selon un test A. Ce test consiste à établir l'aptitude à la rétrogradation d'un produit donné au cours de cycles répétés de gel/dégel. La rétrogradation observée du produit, et l'enthalpie de déstructuration du produit qui a  
10 pu rétrograder, déterminée par Analyse Calorimétrique Différentielle, renseignent donc sur la stabilité du produit considéré.

Le test A consiste plus précisément à effectuer une préparation aqueuse du produit à tester à 40 % de matière  
15 sèche. On effectue différents prélèvements dans des creusets hermétiquement clos. L'ensemble des creusets est porté pendant 15 min à une température de 100°C pour réaliser la gélatinisation ou la mise en solution, et on soumet ensuite ces creusets à un traitement de cycles de  
20 gel/dégel, chacun des cycles consistant à amener et maintenir ladite préparation pendant 15 min à une température de -20°C, puis à une température de 20°C et à la maintenir ensuite pendant 1 h 30 à cette température.

Une analyse calorimétrique différentielle est ensuite  
25 réalisée à chaque cycle, sur équipement PERKIN ELMER, pour la détermination de l'enthalpie de déstructuration du produit qui a pu alors rétrograder.

La stabilité aux cycles de gel/dégel s'apprécie donc en premier lieu par le nombre de cycle de gel/dégel au delà  
30 duquel on peut réaliser cette mesure de la valeur

d'enthalpie requise pour déstructurer le gel d'amidon qui a alors rétrogradé.

Les polymères solubles de glucose conformes à l'invention soumis à ces cycles répétés de gel/dégel  
5 présentent, de manière surprenante et inattendue, une « faible tendance à la rétrogradation », c'est-à-dire ici une absence partielle, voire totale de rétrogradation selon le test A et en fonction de leur teneur en liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6.

10 C'est ainsi que les polymères solubles de glucose conformes à l'invention qui présentent une teneur en liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6 comprise entre 4 et 5 %, ne commencent à rétrograder significativement qu'au delà du huitième cycle de gel/dégel, en présentant une faible  
15 valeur d'enthalpie de rétrogradation, comme il sera exemplifié ci-après.

On les qualifie de polymères solubles de glucose branchés présentant une « très faible tendance à la rétrogradation ».

20 Quant aux polymères solubles de glucose conformes à l'invention qui présentent une teneur en liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6 comprise entre 5 et 6,5 %, aucune rétrogradation de la solution n'est constatée même après 12 cycles de gel/dégel, ce qui explique pourquoi aucune  
25 enthalpie de déstructuration ne peut être établie.

Il est particulièrement surprenant que les polymères solubles de glucose conformes à l'invention, puissent présenter une telle stabilité. En effet, les mesures effectuées avec le test A, sur les amidons waxy et les  
30 amidons waxy réticulés et acétylés, (tels ceux préparés en suivant les enseignements du brevet US 2.928.828)

rétrogradent entre le quatrième et le sixième cycle de gel/dégel, comme il sera montré dans l'exemple 2.

Il n'existe donc pas, à la connaissance de la société Demanderesse, de polymères solubles de glucose qui  
5 présentent une telle stabilité.

Cette propriété destine tout naturellement les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention à des compositions utilisables en industrie alimentaire, qui présentent alors des stabilités élevées au  
10 stockage.

Un autre avantage de l'invention est de permettre l'obtention d'un produit fini, utilisable par exemple comme liant instantané dans des produits réfrigérés ou surgelés.

La société Demanderesse a en outre trouvé que les  
15 polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention présentent des profils rhéologiques tout à fait particuliers.

L'analyse de viscosité des polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention est réalisée grâce  
20 à un test B mis au point par la société Demanderesse pour cette gamme particulière de produits solubles.

Il ne s'agit pas en effet ici de produits granulaires tels qu'habituellement décrits et analysés dans l'état de la technique, mais de polymères solubles de glucose  
25 branchés qui présentent de manière surprenante et inattendue une remarquable solubilité dans l'eau froide.

Le test B consiste à préparer tout d'abord le produit à analyser par précipitation à l'éthanol, séchage sous vide puis broyage au mortier, et enfin tamisage sur tamis de  
30 maille 125  $\mu\text{m}$ . Une masse de 4,4 g du produit sec à analyser ainsi obtenu est alors introduite, avec 6,75 g de glycérol

à 98 % de pureté, dans le bol d'un Rapid Visco Analyser (RVA - Newport Scientific), et l'ensemble est soigneusement homogénéisé à l'aide d'une micro-spatule.

Une quantité d'eau déminéralisée est ensuite ajoutée,  
5 afin d'obtenir une masse finale de 28 g. L'ensemble est alors immédiatement agité. Le profil d'analyse temps / température et vitesse dans le RVA est alors réalisé comme suit. L'échantillon est agité à 100 rpm à une température de 25°C durant 5 s, puis à 500 rpm pendant 25 s.  
10 L'agitation est alors maintenue à 160 rpm durant le reste du profil. La température initiale de 25 °C est maintenue durant 10 min, puis elle est augmentée à 90°C en 8 min. Cette température de 90°C est ensuite maintenue 3 min, diminuée à 30°C en 8 min, puis maintenue à cette valeur de  
15 30°C durant 5 min.

La viscosité retenue est la viscosité mesurée en centipoises (cP) en fin de profil d'analyse, à 34 min.

Les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention présentent alors une viscosité comprise entre  
20 200 et 5.000 cP.

Plus particulièrement, les polymères solubles de glucose branchés qui ont une teneur en liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6 de l'ordre de 4 à 5 % présentent généralement une viscosité comprise entre 1.000 et  
25 5.000 cP.

Quant aux polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention qui présentent une teneur en liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6 comprise entre 5 et 6,5 %, les valeurs de viscosité déterminées selon le test B sont  
30 généralement comprises entre 200 et 1.000 cP.

Ce résultat traduit non seulement une diminution relative tout à fait remarquable de la viscosité des solutions préparées, mais surtout la possibilité d'accéder à une gamme de produits dont la viscosité peut-être  
5 contrôlée. En comparaison, la valeur de la viscosité de l'amidon waxy de maïs et mesuré dans ces conditions est supérieure à 5.500 cP.

La société Demanderesse a également trouvé que ces valeurs de viscosité des polymères solubles de glucose  
10 branchés conformes à l'invention sont du même ordre de grandeur que les valeurs de viscosité, déterminées en suivant le même test B, des amidons waxy fluidifiés.

Cependant, des analyses complémentaires de mesure de viscosité effectuées après sept jours de stockage à 4°C,  
15 ont permis de mettre en évidence, de manière surprenante et inattendue, une remarquable stabilité de la viscosité des polymères solubles de glucose branchés, contrairement auxdits amidons waxy fluidifiés de même viscosité, comme il sera exemplifié ci-après.

20 Ces produits peuvent donc être par exemple avantageusement utilisés pour la fabrication de préparations alimentaires liquides instantanées, et surtout peuvent permettre d'assurer le stockage de longue durée à basse température.

25 Les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention présentent enfin un poids moléculaire compris entre  $10^5$  et  $5 \cdot 10^8$  daltons. Le poids moléculaire et sa distribution peuvent être déterminés en chromatographie de gel filtration par toute méthode connue en soi par l'homme  
30 du métier, les temps de rétention étant déterminés par

rapport à des amidons standards ayant des poids moléculaires connus.

Ces valeurs de poids moléculaires élevées traduisent également l'intérêt que présentent ces polymères solubles  
5 de glucose branchés, car il n'existe pas, à la connaissance de la société Demanderesse, de polymères de glucose de haut poids moléculaire équivalent, même stabilisés et/ou réticulés, qui présentent simultanément une telle teneur en liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6, une si grande stabilité en  
10 solution et un tel comportement de viscosité.

Pour préparer les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention, on réalise la succession des étapes suivantes qui consiste en ce que l'on :

a. soumet une suspension aqueuse d'amidon ou de dérivé  
15 d'amidon d'une matière sèche au moins égale à 2 % en poids, de préférence de 2 à 5 % en poids, à une température supérieure à 130°C, de préférence comprise entre 140 et 150°C, sous une pression de plus de 3,5 bars, de préférence comprise entre 4 à 5 bars pendant au moins 2 minutes, de  
20 préférence pendant 2 à 5 minutes,

b. traite l'amidon ainsi obtenu avec 500 à 2.000 unités d'enzyme de branchement purifiée à une température comprise entre 25 et 40°C, de préférence à une température de 30°C pendant une durée de 10 min à 20 heures,

25 c. recueille les polymères solubles de glucose branchés ainsi obtenus.

L'amidon est introduit en solution aqueuse à une matière sèche de plus de 2 % en poids, de préférence de 2 à 5 % en poids.

30 Le choix d'une origine, ou d'une qualité d'amidon ou de ses dérivés particuliers, ne revêt qu'une importance

relative, mais il peut être avantageusement choisi un amidon extrait d'une variété waxy. La société Demanderesse a en effet trouvé que les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention sont plus aisément synthétisables à partir d'amidons ou de leurs dérivés, qui  
5 présentent déjà un taux de branchement supérieur à 2 % (teneur en liaisons  $\alpha$ -1,6 glucosidiques classiquement décrite pour l'amylose). De préférence, on choisit de modifier enzymatiquement un amidon de maïs waxy.

10 Cette suspension d'amidon ou de dérivés d'amidon est soumise ensuite à un traitement par cuisson particulier, qui consiste à la traiter à une température supérieure à 130°C, de préférence comprise entre 140 et 150°C, sous une pression de plus de 3,5 bars, de préférence comprise entre  
15 4 à 5 bars pendant au moins 2 minutes, de préférence pendant 2 à 5 minutes. Ce traitement est réalisé avantageusement dans un cuiseur tubulaire à double enveloppe chauffé par fluide thermique, équipement qu'il est aisé à l'homme du métier de se procurer.

20 La deuxième étape du procédé conforme à l'invention consiste à traiter l'amidon ainsi obtenu avec de 500 à 2.000 unités d'enzyme de branchement purifiée à une température comprise entre 25 et 40°C, de préférence à une température de 30°C pendant une durée de 10 min à 20  
25 heures.

Les enzymes de branchement sont choisies dans le groupe constitué des enzymes de branchement du glycogène et des enzymes de branchement de l'amidon. Plus préférentiellement, on choisit les enzymes de branchement  
30 de l'amidon, et plus préférentiellement encore les enzymes

de branchement de l'amidon d'algue unicellulaire, et par exemple celles de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

L'isolement des dites enzymes de branchement de l'amidon d'algue unicellulaire peut être effectué par tout  
5 moyen connu en soi par l'homme du métier. La société Demanderesse recommande cependant de mettre en oeuvre le procédé de préparation décrit dans la demande de brevet français déposée sous le n° 98/12051, dont elle est titulaire.

10 L'accès aux enzymes purifiées peut être réalisé à partir du mélange d'enzymes d'algue ainsi obtenu, en mettant en oeuvre directement des techniques de séparation chromatographique en elles-mêmes connues, ou par l'utilisation des techniques de l'ADN recombinant.

15 Il peut être en effet avantageux de préférer isoler et exprimer les gènes codant pour les enzymes de branchement de l'amidon d'algue unicellulaire dans un micro-organisme plus facilement manipulable que les algues unicellulaires.

20 La technique, connue en soi par l'homme du métier, consiste alors par exemple à :

- produire des anticorps polyclonaux spécifiques de chacune des enzymes de branchement de l'amidon d'algue préalablement purifiée,
- 25 - cribler, avec lesdits anticorps spécifiques, une banque d'expression d'ADN génomique de l'algue unicellulaire considérée,
- isoler les fragments d'ADN à partir des clones de ladite banque d'expression d'ADN génomique qui ont réagi avec l'un  
30 et/ou l'autre des anticorps polyclonaux spécifiques,



- introduire lesdits fragments d'ADN correspondants aux gènes codant pour les enzymes de branchement de l'amidon d'algue unicellulaire dans des bactéries permettant leur expression.

5 Les enzymes de branchement de l'amidon d'algue produites par ce procédé sont dites des enzymes de branchement recombinantes, puisque en provenance d'une algue unicellulaire, puis transférées génétiquement et exprimées dans un micro-organisme d'une autre espèce, en  
10 l'occurrence ici une bactérie.

Pour préparer les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention, on fait donc agir avantageusement une enzyme de branchement de l'amidon d'algue purifiée recombinante sur une colle d'amidon de  
15 maïs waxy préparé selon l'étape a) dudit procédé.

La dernière étape du procédé conforme à l'invention consiste donc à collecter les polymères solubles de glucose branchés ainsi obtenus.

Les produits sont précipités par 3 volumes d'éthanol,  
20 purifiés et séchés sous vide pendant 24 heures.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples non limitatifs décrits ci-dessous

#### 25 Exemple 1

La préparation des polymères solubles de glucose branchés s'effectue comme suit. On prépare une suspension d'amidon de maïs waxy d'une teneur en matière sèche de 2,5 % en poids. On traite ensuite cette suspension dans un  
30 cuiseur tubulaire à double enveloppe chauffé par fluide thermique de laboratoire, à une température de 145°C, sous

une pression de 4 bars. Le débit d'alimentation est de 40 ml/min, pour un temps de séjour dans ledit cuiseur de 3 minutes.

1,5 litres de cette préparation sont refroidis à  
 5 température ambiante et placés dans un milieu tamponné à  
 pH 7 par du tampon Tris HCl 0,1 M final pour un volume  
 total de 3,750 litres. On ajoute 19 ml (1.100 U/mg,  
 activité mesurée par la méthode de dosage à la  
 phosphorylase A connue en soi par l'homme du métier) d'une  
 10 solution d'enzymes de branchement de l'amidon recombinantes  
 de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* préalablement  
 purifiées, et on laisse agir à 30°C pendant 30 min pour  
 obtenir des polymères solubles de glucose branchés  
 conformes à l'invention présentant une teneur en liaisons  
 15 glucosidiques  $\alpha$ -1,6 de 4,3 % (produit A), et pendant  
 2 heures, pour obtenir des polymères solubles de glucose  
 branchés, conformes à l'invention, présentant une teneur en  
 liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6 de 6 % (produit B). Chacun  
 des produits est ensuite précipité à l'éthanol, filtré,  
 20 rincé et séché sous vide pendant 24 heures.

### Exemple 2

La détermination de la stabilité des polymères  
 25 solubles de glucose branchés conformes à l'invention est  
 réalisée par la mesure de l'enthalpie de déstructuration du  
 produit rétrogradé, si produit rétrogradé il y a, par  
 Analyse Calorimétrique Différentielle, au cours de cycles  
 répétés de gel/dégel.

30 Deux polymères solubles de glucose branchés conformes  
 à l'invention, présentant respectivement une teneur en

liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6 de l'ordre de 4,3 % (produit A) et de l'ordre de 6 % (produit B) sont préparés comme indiqué dans l'exemple 1. L'analyse est également effectuée sur deux autres échantillons : de l'amidon de maïs waxy (produit C) et un amidon waxy réticulé et acétylé, présentant un indice d'acétyle de 1,8 (produit D).

Comme indiqué dans le test A, on constitue une préparation aqueuse de chacun des 4 échantillons à 40 % de matière sèche placés dans un ensemble de creusets hermétiquement clos, et on chauffe pendant 15 min à 100°C dans un four DSC4 de PERKIN ELMER. On réalise pour chaque creuset de 2, 4, 6, 8, 10 ou 12 cycles successifs de gel/dégel en suivant le protocole suivant : 15 min à -22°C, puis 1h30 à 20°C. Une mesure de l'enthalpie de rétrogradation est effectuée sur chaque creuset en le plaçant dans le calorimètre différentiel PERKIN ELMER.

Le tableau I suivant présente les mesures d'enthalpie de rétrogradation déterminées pour chacun des 4 produits testés au cours de 12 cycles successifs de gel/dégel.

Tableau I. Détermination des enthalpies de rétrogradation au cours des 12 cycles de gel/dégel, exprimées en J/g de préparation.

PRODUITS	Cycle 2	Cycle 4	Cycle 6	Cycle 8	Cycle 12
A	0	0	0	0	0,2
B	0	0	0	0	0
C	0	0	0,4	1	2,2
D	0	0,10	0,35	0,6	1,75

Les polymères solubles de glucose branchés présentent donc une remarquable stabilité, même après 12 cycles de gel/dégel. Si l'amidon waxy (produit C) et l'amidon waxy réticulé et acétylé (produit D) commencent à rétrograder à

partir du 4<sup>ème</sup> cycle de gel/dégel, il n'en est pas de même pour chacun des polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention préparés à partir dudit amidon waxy. Le procédé enzymatique mis en oeuvre pour modifier  
 5 les amidons et dérivés d'amidon permet donc de leur assurer une excellente stabilité, bien supérieure en l'état aux amidons waxy stabilisés et/ou réticulés.

### Exemple 3

10 La caractérisation rhéologique des polymères solubles de glucose branchés est réalisée à l'aide d'un Rapid Visco Analyser (RVA).

Les produits conformes à l'invention présentant une remarquable solubilité dans l'eau froide. Il a donc été  
 15 nécessaire de mettre au point une méthode de détermination de viscosité propre à ce type de produit. Comme indiqué dans le test B, 4,4 g du produit sec à tester sont mélangés avec du glycérol et de l'eau pour atteindre une masse finale de 28 g.

20 Les produits analysés sont d'une part, les produits A, B et C décrits dans l'exemple 2 et deux autres produits E et F, correspondants à des amidons de maïs waxy fluidifiés à deux niveaux de fluidification (valeur appréciée par la mesure classique de la fluidité dans  
 25 l'eau, i.e. l'indice de « water fluidity » ou WF), obtenus par traitement en conditions acides connues en soi par l'homme du métier, le produit F présentant un WF de 50, et le produit G, un WF de 65.

Le profil d'analyse temps / température et vitesse  
 30 dans le RVA est alors réalisé comme suit. L'échantillon est agité à 100 rpm à une température de 25°C durant 5 s, puis

à 500 rpm pendant 25 s. L'agitation est alors maintenue à 160 rpm durant le reste du profil.

La température initiale de 25 °C est maintenue durant 10 min, puis elle est augmentée à 90°C en 8 min. Cette température de 90°C est ensuite maintenue 3 min, diminuée à 30°C en 8 min, puis maintenue à cette valeur de 30°C durant 5 min. Le tableau II suivant présente les résultats de viscosité pour les produits A, B, C, E et F, exprimés en centipoises.

10

Tableau II. Détermination des viscosités en fin de profil temps/température et vitesse en RVA des produits A, B, C, E et F, exprimées en centi-Poises (cP)

PRODUITS	Viscosité à 34 min
A	1600
B	750
C	6060
E	1140
F	660

15

Les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention présentent encore une certaine viscosité, mais remarquablement plus faible que celle du témoin amidon waxy (C).

20

On remarque que ces valeurs de viscosité sont du même ordre de grandeur que les amidons waxy fluidifiés.

Une étude complémentaire est réalisée par mesure de la viscosité après stockage durant 7 jours à 4°C.

Cette étude permet de caractériser la stabilité des colles ainsi fabriquées dans le temps et de déterminer en quoi les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention diffèrent des amidons waxy fluidifiés.

25

On réalise le stockage des bols du RVA contenant chacun des cinq produits à 4 °C.

La viscosité est ensuite à nouveau déterminée par le RVA. Le profil d'analyse temps / température et vitesse est alors caractérisé par une vitesse et une température maintenues respectivement à 160 et 30°C pendant 20 min.

La viscosité retenue est la viscosité moyenne mesurée en cP entre 15 et 20 min.

Le tableau III suivant présente les résultats de viscosité obtenus après 7 jours de stockage à 4 °C des produits A, B, C, E et F.

Tableau III. Détermination des viscosités des produits après stockage pendant 7 jours à 4°C, exprimées en cP.

PRODUITS	Viscosité après 7 jours à 4 °C
A	2500
B	850
C	8650
E	Gel-blanc, dur, ferme*
F	Gel blanc, dur, ferme*

\* : viscosité non mesurable.

Les résultats montrent clairement que les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention présentent une viscosité remarquablement stable même après un stockage à 4°C. Cette faible viscosité peut donc être mise à profit avantageusement pour des préparations alimentaires qui nécessitent que l'ingrédient amylicé qui les composent soit de faible viscosité (telles que les préparations liquides instantanées) et qui demandent à être

stockées pendant une longue période de temps à basses températures.

## REVENDEICATIONS

1. Polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons  $\beta$  glucosidiques, caractérisés par le fait qu'ils possèdent :

- 5        - entre 4 et 6,5 % de liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6,
- une tendance très faible ou nulle à la rétrogradation en solution aqueuse, déterminée selon un test A.
- une viscosité, déterminée selon un test B, comprise
- 10        entre 200 et 5.000 cP,
- un poids moléculaire compris entre  $10^5$  et  $5.10^8$  daltons.

2. Polymères solubles de glucose branchés selon la revendication 1, caractérisés par le fait qu'ils

15        présentent :

- entre 4 et 5 % de liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6,
- une très faible tendance à la rétrogradation, déterminée selon le test A,
- une viscosité, déterminée selon le test B, comprise
- 20        entre 1.000 et 5.000 cP.

3. Polymères solubles de glucose branchés selon la revendication 2, caractérisés par le fait qu'ils présentent de l'ordre de 4,3 % de liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6 et une viscosité en solution aqueuse de l'ordre de 1600 cP.

25        4. Polymères solubles de glucose branchés selon la revendication 1, caractérisés par le fait qu'ils présentent :

- entre 5 et 6,5 % de liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6,
- une tendance nulle à la rétrogradation en solution
- 30        aqueuse, déterminée selon le test A.



- une viscosité, déterminée selon un test B, comprise entre 200 et 1.000 cP.

5. Polymères solubles de glucose branchés selon la revendication 4, caractérisés par le fait qu'ils présentent  
5 de l'ordre de 6 % de liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,6, et une viscosité en solution aqueuse de l'ordre de 750 cP.

6. Procédé de fabrication de polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons  $\beta$  glucosidiques conformes à l'une quelconque des  
10 revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que l'on :

a. soumet une suspension aqueuse d'amidon ou de dérivé d'amidon d'une matière sèche au moins égale 2 % en poids, de préférence de 2 à 5 % en poids, à une température supérieure à 130°C, de préférence comprise entre 140 et  
15 150°C, sous une pression de plus de 3,5 bars, de préférence comprise entre 4 à 5 bars pendant au moins 2 min, de préférence pendant 2 à 5 min,

b. traite l'amidon ou le dérivé amidon ainsi obtenu avec 500 à 2.000 unités d'enzyme de branchement purifiée à  
20 une température comprise entre 25 et 40°C, de préférence à une température de 30°C, pendant une durée de 10 min à 20h,

c. recueille les polymères solubles de glucose branchés ainsi obtenus.

7. Procédé de fabrication de polymères solubles de  
25 glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons  $\beta$  glucosidiques selon la revendication 6, caractérisé par le fait que l'enzyme de branchement est choisie dans le groupe constitué par les enzymes de branchement du glycogène, les enzymes de branchement de  
30 l'amidon et les mélanges quelconques de ces enzymes.

8. Procédé de fabrication de polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons  $\beta$  glucosidiques selon l'une ou l'autre des revendications 6 et 7, caractérisé par le fait que l'enzyme de branchement est extraite d'organismes et/ou de micro-organismes choisis dans le groupe constitué par les plantes supérieures, les levures, les bactéries et les algues unicellulaires, et est de préférence extraite d'algues unicellulaires.
9. Procédé de fabrication de polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons  $\beta$  glucosidiques selon la revendication 8, caractérisé par le fait que l'enzyme de branchement extraite d'algues est obtenue par isolement à partir d'un organisme génétiquement modifié capable d'exprimer la dite enzyme.
10. Compositions destinées à être utilisées dans les industries alimentaires, caractérisées en ce qu'elles renferment les polymères solubles de glucose branchés selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou susceptibles d'être obtenus selon l'une des revendications 6 à 9.